

**Universitat de Lleida**

Document downloaded from:

<http://hdl.handle.net/10459.1/70930>

The final publication is available at:

<https://doi.org/10.1016/j.regg.2018.05.006>

Copyright

(c) Sociedad Española de Geriatría y Gerontología, 2019

## **Biosíntesis *de novo* de glicerofosfolípidos y longevidad**

**Autores:** Natalia Mota-Martorell, Irene Pradas, Mariona Jové, Alba Naudí, Reinald Pamplona\*

**Centro:** Departament de Medicina Experimental, Universitat de Lleida-Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (UdL-IRBLleida), 25198 Lleida, España

### **Autor para correspondencia:**

Prof. Dr. Reinald Pamplona

Departament de Medicina Experimental, Universitat de Lleida-Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (UdL-IRBLleida), Edifici Biomedicina 1, Av. Alcalde Rovira Roure-80, 25198 Lleida, España

Teléfono: (+34)973702442

E-mail: [reinald.pamplona@mex.udl.cat](mailto:reinald.pamplona@mex.udl.cat)

## Resumen

**Introducción.** Entre los principales componentes lipídicos de las membranas celulares se encuentran los glicerofosfolípidos (GFL), que se sintetizan en una vía *de novo* a partir del diacilglicerol (DAG). El perfil lipídico es una característica optimizada asociada con la longevidad animal. En este contexto, hipotetizamos que la tasa de biosíntesis de DAGs y, por extensión, de GFL, guarda una relación con la longevidad de una especie animal.

**Material y métodos.** Se realiza un análisis lipídico basado en espectrometría de masas del plasma de 11 especies de mamíferos que cubren un rango de longevidad máxima de 3,5 a 120 años. La identificación de especies lipídicas se basa en masa exacta, tiempo de retención y distribución isotópica. Se aplica un test ANOVA para obtener las especies lipídicas diferenciales entre las especies y la correlación de Spearman para establecer su asociación con la longevidad. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS y el software para el análisis metabolómico *Metaboanalyst*.

**Resultados.** Entre las 1061 especies moleculares lipídicas diferenciales se identifican 47 DAGs, 14 de los cuales presentan una correlación significativa y negativa con la longevidad animal. El análisis multivariante muestra que solamente con estos 14 DAGs somos capaces de discriminar una especie animal y su longevidad máxima.

**Conclusiones.** Éstos resultados sugieren que las especies longevas tienen una menor tasa de biosíntesis *de novo* de GFL, posiblemente asociada a una menor tasa de recambio de los lípidos de membrana, lo que conllevaría un menor coste energético.

**Palabras clave:** Diacilglicéridos; Espectrometría de masas; Lipidómica; Longevidad máxima.

## Abstract

**Background.** Among main lipid components of the cellular membranes are glycerophospholipids (GPL), synthesized from diacylglycerol (DAG). The lipid profile is an optimized feature associated with animal longevity. In this context, we hypothesize that the DAG biosynthesis rate, and thus, the GPL content, is related to animal longevity.

**Material and methods.** Plasma lipidomic analysis based on mass spectrometry of 11 mammalian species with a maximum longevity ranging from 3.5 to 120 years was performed. Lipid identification was based on exact mass, retention time and isotopic distribution. ANOVA test was applied to determine differential lipids between animal species meanwhile the association between these lipids and longevity was carried out with a Spearman correlation. Data was analysed using SPSS and Metaboanalyst.

**Results.** Among 1061 differential lipid molecular species found between species, 47 were defined as DAG. Interestingly, 14 of them showed a negative correlation with mammalian maximum longevity. Multivariate statistics revealed that 14 DAGs are enough to define mammalian species and their maximum longevity.

**Conclusions.** Data suggest long-lived mammalian species have lower rate of GPL synthesis through the *de novo* pathway, possibly associated to a lower rate of membrane lipid exchange, which in turn is related to lower energy expenditure.

**Keywords:** Diacylglycerides; Lipidomics; Mass spectrometry; Maximum longevity.

## Introducción

La función primaria de los lípidos en los sistemas biológicos es generar membranas. Fue posteriormente durante la evolución que esta propiedad se extendió a nuevas funciones tales como la señalización celular y, más tarde, el almacenamiento de energía. Los lípidos son macromoléculas esenciales para la vida que se encuentran en todos los organismos vivos, constituyendo los elementos centrales de las membranas biológicas. Durante la década de los 70-80 se describió por primera vez que la composición lipídica varía de forma sistemática entre las distintas especies de mamíferos <sup>1,2</sup>.

Existen evidencias científicas que sugieren que la vida aeróbica, y las especies longevas, han evolucionado reduciendo el contenido de aquellos componentes con mayor susceptibilidad de ser dañados oxidativamente, lo que les confiere una mayor estabilidad estructural <sup>3</sup>. En términos lipídicos, esto se traduce en una disminución del grado de insaturación y, en consecuencia, una mayor resistencia a la oxidación, de las membranas biológicas tisulares en las especies más longevas <sup>4-9</sup>, incluyendo vertebrados <sup>10-13</sup> e invertebrados <sup>14-16</sup> de longevidad extrema. Al presentar una longevidad 5 veces mayor de lo esperado por su peso corporal <sup>17</sup>, los humanos son considerados una especie animal de longevidad extrema y, como tales, comparten las características lipídicas típicas de las especies longevas. En este sentido, se ha observado que los individuos descendientes de nonagenarios tienen membranas eritrocitarias más resistentes a la peroxidación <sup>18</sup>.

Dado que la mayoría de estudios se han realizado a nivel tisular, son pocos los trabajos que han determinado las posibles adaptaciones de los lípidos plasmáticos a la longevidad de las especies animales. En un estudio de fisiología comparada

publicado recientemente se demuestra que existe un lipidoma plasmático asociado a la longevidad de las especies caracterizado por un menor contenido plasmático de glicerofosfolípidos (GFL) y ácidos grasos libres de cadena larga, mayor resistencia a la oxidación lipídica y menor contenido de productos derivados de la peroxidación lipídica <sup>19</sup>. En humanos de edad avanzada, se ha descrito un lipidoma plasmático caracterizado por una mayor capacidad antioxidante <sup>20,21</sup>.

Los estudios ómicos de carácter comparado permiten abordar la evolución del genoma y la expresión genética. Dado que existe una relación bidireccional entre metabolitos y expresión génica, el estudio comparado del metaboloma nos permite definir posibles rutas metabólicas relacionadas con la evolución de los mamíferos. En este sentido, hemos diseñado un estudio de comparada dónde analizamos el lipidoma plasmático de 11 especies distintas, abarcando un rango de longevidad máxima (o MLSP, del inglés *Maximum lifespan potential*) de entre 3,5 y 120 años. Hemos podido definir la existencia de una correlación negativa entre el contenido de diacilglicéridos (DAG) y la MLSP de las especies, que podría explicar el menor contenido de GFL plasmáticos descrito en las especies más longevas, además de definir un modelo capaz de predecir la longevidad animal basándonos en 14 DAGs plasmáticos.

## Material y métodos

### Animales

Las especies de mamíferos participantes en el presente estudio cubren un rango de longevidad máxima de 3.5 a 120 años. Todos los especímenes son machos adultos de una edad correspondiente al 15-30% de su longevidad máxima. Así, por ejemplo, la edad de los ratones era de 8 meses, mientras que la de los humanos participantes era de entre 20 y 35 años. En el estudio se incluyen las siguientes especies animales (especie; MLSP en años; tamaño muestral n): ratón (*Mus musculus*; 3,5; n = 6), rata (*Rattus norvegicus*; 4,5; n = 10), cobaya (*Cavia porcellus*; 8; n = 12), conejo (*Oryctolagus cuniculus*; 13; n = 10), gato (*Felis catus*; 20; n = 12), perro (*Canis familiaris*; 20; n = 12), oveja (*Ovis aries*; 20; n = 12), cerdo (*Sus scrofa*; 27; n = 12), toro (*Bos taurus*; 30; n = 9), caballo (*Equus caballus*; 46; n = 12) y humano (*Homo sapiens*; 120; n = 15). Las muestras biológicas de las diferentes especies animales fueron suministradas por Charles River Laboratories España, SA; y las de humanos se obtuvieron de voluntarios sanos. Todas las muestras de sangre se obtuvieron en ayunas (8-12h) mediante punción cardíaca para ratones, de aorta abdominal para las ratas, y por venopunción para el resto de las especies (humanos incluidos), fueron centrifugadas para separar la fracción plasmática y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, transferidas y almacenadas antes de 4h a -80°C, y utilizadas posteriormente en el análisis lipidómico.

Los protocolos de obtención y uso de muestras biológicas de origen animal fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Lleida, mientras que los protocolos humanos lo fueron por el Comité Ético en Investigación Clínica del Hospital Universitario Arnau de Vilanova (de acuerdo con la



Declaración de Helsinki). Todos los individuos fueron informados sobre los objetivos y la extensión de la investigación y firmaron un consentimiento informado.

### **Análisis lipidómico**

El análisis lipidómico se basa en un método descrito previamente <sup>19</sup>. Con el objetivo de precipitar la proteína, 600 µl de acetona fría se añadieron a 200 µl de muestra (25 µl de plasma y 175 µl de tampón fosfato). Posteriormente, las muestras fueron agitadas vigorosamente durante 10 s y suavemente a 4°C durante 30 min. Seguidamente, las muestras fueron centrifugadas a 1400 rpm durante 10 min y el sobrenadante fue evaporado en un Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España). Se añadieron estándares internos representativos de las familias lipídicas, tal y como se describió previamente <sup>19</sup>. Los lípidos plasmáticos se extrajeron añadiendo metanol:cloroformo:0.7% cloruro potásico (1:2:1, v/v/v). Después de que las muestras fueran agitadas y centrifugadas a 1400 rpm durante 10 min, la fracción de cloroformo se separó y evaporó en el Speed Vac (Thermo Fisher Scientific, Barcelona, España). Finalmente, las muestras se resuspendieron en cloroformo:metanol (1:3, v/v) y se inyectaron en el sistema cromatógrafo. Los extractos lipídicos fueron sometidos a espectrometría de masas utilizando la plataforma Agilent LC 1200 series acoplada a un ESI-QTOF-MS/MS 6520 (Agilent Technologies, Barcelona, España). Brevemente, en el método de cromatografía líquida (LC), 2 µL de muestra fueron inyectados en una columna de fase reversa (LXBridge C18 column, 2.1 X 150 mm, 3.5 µm, Waters Corp., Milford, MA, USA) equipada con una pre-columna de fase reversa (XBridge C18, 2.1X10 mm, 3.5 µm, Waters Corp., Milford, MA, USA) a 55°C. El flujo fue de 250 µl/min con el solvente A formado por acetato de amonio en metanol-agua (90:10, v/v) y el solvente B por acetato de amonio 5 mM en 1-propanol-hexano-agua (79:20:1, v/v/v). El gradiente

consistió en 100% solvente A durante 2 min, del 0% al 100% en 30 min, manteniendo el 100% B durante 3 min, volver al 0% B en 20 min, y reequilibrar a 0% solvente B durante 4 min. Los datos se recogieron en modo TOF de ionización positiva y negativa, y se adquirieron todas las masas en un rango dinámico extendido (2 GHz) de 100-3000 m/z, usando N<sub>2</sub> como gas nebulizador (5L/min, 350°C). El voltaje del capilar fue de 3500 V, con una velocidad de adquisición de 1 scan/s.

La adquisición de datos fue llevada a cabo con MassHunter Data Analyses Software (Agilent Technologies, Barcelona, España) y se utilizó MassHunter Qualitative Analysis Software (Agilent Technologies, Barcelona, España) para obtener las características moleculares de las muestras, tal como se ha descrito anteriormente<sup>19</sup>. Se utilizó MassHunter Mass Profiler Professional Software (Agilent Technologies, Barcelona, España) para el análisis lipidómico no dirigido a partir del cual se seleccionaron los 14 DAGs. Finalmente, se utilizó el paquete de R OrbisMet (disponible en <http://hdl.handle.net/10609/65305>) y el paquete estadístico SPSS/PC para Windows (SPSS, Chicago, IL) para el análisis de correlaciones, curvas de regresión y análisis multivariante (Análisis de Componentes Principales (PCA, del inglés *Principal Component Analyses*) y Random Forest).

## Resultados

### Relación entre longevidad máxima y diacilglicéridos plasmáticos

Se detectó la presencia de 1061 lípidos plasmáticos diferenciales entre las especies estudiadas. De los lípidos identificados, 47 eran DAGs, y 14 de éstos correlacionaban negativamente con la MLSP tras aplicar la correlación de *Spearman* ( $r$ ) (**Tabla 1**). El *heatmap* de la **Figura 1** muestra el grado de correlación entre los 14 DAGs y la longevidad máxima (MLSP) de las especies animales. En el análisis de regresión se observó que la relación entre la abundancia de los 14 DAGs y la MLSP es de tipo exponencial en casi todos ellos (**Tabla 2**). En la **Figura 2** se muestran gráficamente aquellos DAGs que correlacionan negativamente con la longevidad y muestran un mejor ajuste a un modelo exponencial (DAG(39:7):  $R^2 = 0.46$ ,  $r = -0.29$ ,  $p = 0.001$ ; DAG(39:6):  $R^2 = 0.45$ ,  $r = -0.43$ ,  $p < 0.001$ ; DAG(37:3):  $R^2 = 0.35$ ,  $r = -0.26$ ,  $p = 0.004$ ; DAG(32:2):  $R^2 = 0.35$ ;  $r = -0.23$ ,  $p = 0.009$ ). Globalmente, estas correlaciones demuestran una disminución progresiva en el contenido de los DAGs estudiados conforme aumenta la longevidad máxima en las diferentes especies de mamíferos.

En un intento por discernir si existe alguna particularidad que defina los DAGs que correlacionan con la longevidad animal, se procede a realizar una distribución de los mismos, tanto si correlacionan (14 especies lipídicas) como si no (33 especies lipídicas) de acuerdo al número de átomos de carbono y número de dobles enlaces (**Figura 3** y **Figura Suplementaria 1**). Los resultados, a pesar de no mostrar un patrón claramente diferencial entre aquellos DAGs que correlacionan con la longevidad máxima de las especies y los que no, si que demuestran que i) aquellos que no correlacionan poseen mayoritariamente más de 40 carbonos, y ii) aquellos

que correlacionan presentan PUFAs en sus cadenas y especialmente con 3 o 4 dobles enlaces.

Un paso más allá en el establecimiento de un perfil lipídico de DAGs que correlacionen con la MLSP sería un análisis dirigido que permita discernir la presencia de ácidos grasos específicos, así como la posición estructural dentro de la molécula (*sn*-1, *sn*-2 o *sn*-3), ya que la identificación efectuada en el análisis no dirigido no permite llegar a este detalle.

### **Relación entre el contenido de glicerofosfolípidos plasmáticos y la especie animal**

El análisis estadístico multivariante no supervisado, concretamente el análisis de componentes principales (PCA, del inglés *Principal Component Analysis*), revela que, utilizando sólo estos 14 DAGs, somos capaces de definir especies animales con distinta longevidad, siendo *C. porcellus* y *O. aries* los más bien caracterizados (**Figura 4**).

La capacidad de éstos 14 DAGs para definir una especie animal se validó aplicando un análisis de tipo bosques aleatorios (o *Random Forest*), que reveló un error global de clasificación del 16% (**Tabla 3**). De este modo, con únicamente 14 DAGs se puede definir la especie animal con una probabilidad de acierto del 84%. Concretamente, este tipo de análisis permitiría clasificar correctamente los individuos de *C. porcellus* (error de clasificación del 0%), *S. scrofa* (error de clasificación del 0%), *O. aries* (error de clasificación del 8.33%) y *E. caballus* (error de clasificación del 8.33%) pero no sería útil para clasificar el *O. cuniculus* (error de clasificación del 50%) y *F. catus* (error de clasificación del 33.3%).

## Discusión

Los DAGs son los precursores de la biosíntesis *de novo* de GFL, incluyendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol y cardiolipina <sup>22</sup>. Los GFL constituyen los principales componentes de las membranas biológicas, y el contenido de éstos varía en función del tipo celular y orgánulo<sup>23</sup>.

Los GFL participan en el mantenimiento de las propiedades estructurales y funcionales de las membranas celulares, así como en diversidad de funciones como el tráfico vesicular y la señalización intracelular <sup>22</sup>, constituyéndose también en un sustrato biológico determinante de la longevidad de las especies animales. Estudios comparativos entre especies de distinta longevidad muestran una reducción de GFL a nivel tisular <sup>8,17,24</sup> y plasmático <sup>25,26</sup> que se mantiene en humanos <sup>20,21,27,28</sup>. Nuestros resultados sugieren que el menor contenido de DAGs podría explicar, en parte, el menor contenido de GFLs en las especies más longevas. Además, el elevado contenido de DAGs y GFLs documentados en varias condiciones patológicas <sup>29,30</sup> refuerzan el posible papel beneficioso de una reducción de dichas especies lipídicas en especies animales longevas.

En este estudio se propone un modelo capaz de discernir entre la longevidad máxima de las especies en base al contenido plasmático de 14 DAGs con una probabilidad de acierto del 84%. Los GFLs constituyen uno de los factores determinantes de la longevidad puesto que representan el 42.5% de las especies lipídicas que correlacionan de forma inversa con la longevidad de los mamíferos, mientras que los glicerolípidos (GL) solamente representan el 17.5% <sup>19</sup>. La existencia de un perfil lipídico específico asociado a la longevidad, capaz de

identificar individuos longevos únicamente con 20 especies lipídicas, ya se había descrito anteriormente en humanos <sup>28</sup>. En este sentido, los resultados obtenidos refuerzan la importancia del lipidoma plasmático como factor clave de la longevidad.

No obstante, siguiendo con la línea de los resultados obtenidos, el contenido plasmático de los DAGs no es el único factor que determina la longevidad de las especies. En este sentido, se ha demostrado la existencia de mecanismos moleculares compartidos entre las distintas especies, incluyendo la presencia de membranas más resistentes a la oxidación en especies longevas <sup>4,7,8,14,15,31</sup>. Además, estudios recientes sugieren también la existencia de mecanismos reguladores adicionales de la longevidad específicos de cada especie animal <sup>32,33</sup>, hecho que dificulta el establecimiento de modelos generales predictivos de la longevidad.

## **Conflicto de interés**

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## **Contribución de los autores**

Concepción y diseño del estudio: R. Pamplona. Recogida de muestras y procedimientos experimentales: N. Mota-Martorell, I. Pradas, M. Jové, A. Naudí y R. Pamplona. Análisis estadístico e interpretación de los resultados: N. Mota-Martorell, I. Pradas, M. Jové, A. Naudí y R. Pamplona. Redacción del manuscrito: N. Mota-Martorell, I. Pradas, M. Jové, A. Naudí y R. Pamplona. Edición del manuscrito: R. Pamplona. Todos los autores participaron en la revisión crítica del manuscrito y todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final. Asimismo, todos los autores tuvieron pleno acceso a los datos del estudio y tuvieron la responsabilidad final de la decisión de enviarlo para su publicación.

## **Fuentes de financiación**

El trabajo ha sido financiado, en parte, por una ayuda del Ministerio Español de Economía y Competitividad (ref. FIS-PI1400328), y por la Generalitat de Catalunya (2017SGR696 y SLT002/00250) a R. Pamplona. El estudio ha sido cofinanciado por los Fondos de la Unión Europea (“Una manera de hacer Europa”).

## **Agradecimientos**

N. Mota-Martorell tiene concedida una beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya. I. Pradas tiene concedida una beca predoctoral de la Universitat de Lleida. Nuestro agradecimiento a David Argilés y Maria Rosa Gómez por su soporte técnico.

## Bibliografía

1. Gudbjarnason S, Doell B, Oskarsdóttir G. Docosahexaenoic acid in cardiac metabolism and function. *Acta Biol Med Ger.* 1978;37: 777–84.
2. Couture P, Hulbert AJ. Membrane fatty acid composition of tissues is related to body mass of mammals. *J Membr Biol.* 1995;148: 27–39.
3. Pamplona R, Barja G. An evolutionary comparative scan for longevity-related oxidative stress resistance mechanisms in homeotherms. *Biogerontology.* 2011;12: 409–435.
4. Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Ruiz C, Prat J, Bellmunt MJ, et al. Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *J Lipid Res.* 1998;39: 1989–1994.
5. Pamplona R, Portero-Otin M, Riba D, Requena JR, Thorpe SR, Lopez-Torres M, et al. Low fatty acid unsaturation: A mechanism for lowered lipoperoxidative modification of tissue proteins in mammalian species with long life spans. *Journals Gerontol Ser a-Biological Sci Med Sci.* 2000;55: B286–B291.
6. Pamplona R, Portero-Otín M, Ruiz C, Gredilla R, Herrero A, Barja G. Double bond content of phospholipids and lipid peroxidation negatively correlate with maximum longevity in the heart of mammals. *Mech Ageing Dev.* 2000;112: 169–183.
7. Pamplona R, Prat J, Cadenas S, Rojas C, Pérez-Campo R, López Torres M, et al. Low fatty acid unsaturation protects against lipid peroxidation in liver mitochondria from long-lived species: The pigeon and human case. *Mech Ageing Dev.* 1996;86: 53–66.



8. Pamplona R, Portero-Otín M, Requena JR, Thorpe SR, Herrero A, Barja G. A low degree of fatty acid unsaturation leads to lower lipid peroxidation and lipoxidation-derived protein modification in heart mitochondria of the longevous pigeon than in the short-lived rat. *Mech Ageing Dev.* 1999;106: 283–296.
9. Pamplona R, Portero-Otín M, Sanz A, Ayala V, Vasileva E, Barja G. Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigar and canaries than in mice. Relation to aging rate. *Age (Omaha).* 2005;27: 267–280.
10. Hulbert AJ, Faulks SC, Harper JM, Miller RA, Buffenstein R. Extended longevity of wild-derived mice is associated with peroxidation-resistant membranes. *Mech Ageing Dev. NIH Public Access;* 2006;127: 653–7.
11. Hulbert AJ, Beard LA, Grigg GC. The exceptional longevity of an egg-laying mammal, the short-beaked echidna (*Tachyglossus aculeatus*) is associated with peroxidation-resistant membrane composition. *Exp Gerontol.* 2008;43: 729–733.
12. Buttemer WA, Battam H, Hulbert AJ. Fowl play and the price of petrel: long-living Procellariiformes have peroxidation-resistant membrane composition compared with short-living Galliformes. *Biol Lett.* 2008;4: 351–354.
13. Hulbert AJ, Faulks SC, Buffenstein R. Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci.* 2006;61: 1009–1018.
14. Munro D, Blier PU. The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated

- with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell*. 2012;11: 845–855.
15. Haddad LS, Kelbert L, Hulbert AJ. Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes. *Exp Gerontol*. 2007;42: 601–609.
  16. Fuchs S, Bundy JG, Davies SK, Viney JM, Swire JS, Leroi AM. A metabolic signature of long life in *Caenorhabditis elegans*. *BMC Biol. BioMed Central*; 2010;8: 14.
  17. Mitchell TW, Buffenstein R, Hulbert AJ. Membrane phospholipid composition may contribute to exceptional longevity of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): A comparative study using shotgun lipidomics. *Exp Gerontol*. 2007;42: 1053–1062.
  18. Puca AA, Andrew P, Novelli V, Anselmi CV, Somalvico F, Cirillo NA, et al. Fatty acid profile of erythrocyte membranes as possible biomarker of longevity. *Rejuvenation Res*. 2008;11: 63–72.
  19. Jové M, Naudí A, Aledo JC, Cabré R, Ayala V, Portero-Otin M, et al. Plasma long-chain free fatty acids predict mammalian longevity. *Sci Rep*. 2013;3: 3346.
  20. Gonzalez-Covarrubias V, Beekman M, Uh H-W, Dane A, Troost J, Paliukhovich I, et al. Lipidomics of familial longevity. *Aging Cell*. 2013;12: 426–434.
  21. Jové M, Maté I, Naudí A, Mota-Martorell N, Portero-Otín M, De la Fuente M, et al. Human aging is a metabolome-related matter of gender. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci*. 2016;71: 578–585.

22. Hishikawa D, Hashidate T, Shimizu T, Shindou H. Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J Lipid Res. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*; 2014;55: 799–807.
23. Van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: Where they are and how they behave [Internet]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008. pp. 112–124.
24. Ma S, Gladyshev VN. Molecular signatures of longevity: Insights from cross-species comparative studies. *Semin Cell Dev Biol. Elsevier Ltd*; 2017;70: 190–203.
25. Tomás-Loba A, Bernardes de Jesus B, Mato JM, Blasco MA. A metabolic signature predicts biological age in mice. *Aging Cell*. 2013;12: 93–101.
26. De Guzman JM, Ku G, Fahey R, Youm Y-H, Kass I, Ingram DK, et al. Chronic caloric restriction partially protects against age-related alteration in serum metabolome. *Age (Omaha). Springer*; 2013;35: 1091–1104.
27. Yu Z, Zhai G, Singmann P, He Y, Xu T, Prehn C, et al. Human serum metabolic profiles are age dependent. *Aging Cell*. 2012;11: 960–967.
28. Jové M, Naudí A, Gambini J, Borrás C, Cabré R, Portero-Otín M, et al. A stress-resistant lipidomic signature confers extreme longevity to humans. *Journals Gerontol Ser A Biol Sci Med Sci*. 2017;72: 30–37.
29. Graessler J, Schwudke D, Schwarz PEH, Herzog R, Shevchenko A, Bornstein SR. Top-down lipidomics reveals ether lipid deficiency in blood plasma of hypertensive patients. *PLoS One. Public Library of Science*; 2009;4: e6261.

30. Jové M, Naudí A, Portero-Otin M, Cabré R, Rovira-Llopis S, Bañuls C, et al. Plasma lipidomics discloses metabolic syndrome with a specific HDL phenotype. *FASEB J. Federation of American Societies for Experimental Biology*; 2014;28: 5163–71.
31. Shmookler Reis RJ, Xu L, Lee H, Chae M, Thaden JJ, Bharill P, et al. Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging (Albany NY)*. 2011;3: 125–147.
32. Ma S, Yim SH, Lee S-G, Kim EB, Lee S-R, Chang K-T, et al. Organization of the mammalian metabolome according to organ function, lineage specialization, and longevity. *Cell Metab*. 2015;22: 332–43.
33. Wijeyesekera A, Selman C, Barton RH, Holmes E, Nicholson JK, Withers DJ. Metabotyping of long-lived mice using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *J Proteome Res. American Chemical Society*; 2012;11: 2224–35.

## Pies de Figura

**Figura 1.** Heatmap que muestra el grado de correlación entre los 14 diacilglicéridos (DAGs) y la longevidad máxima (MLSP). Cada línea del gráfico representa el valor  $r$  de cada correlación tras aplicar un test de *Spearman*, coloreada en una escala entre -1 (azul) y +1 (rojo), ambos indicando un elevado grado de correlación.

**Figura 2.** Regresión no lineal entre el contenido de DAGs específicos y la longevidad máxima.

**Figura 3.** Relación entre el número de átomos de carbono y el número de dobles enlaces de aquellos DAGs identificados, independientemente de su grado de correlación con la longevidad. En cuadrados rojos, las diferentes especies lipídicas de DAGs que correlacionan con la longevidad máxima, y en triángulos verdes, aquellas especies lipídicas de DAGs que no correlacionan con la longevidad.

**Figura 4.** Gráfico tridimensional de PCA que muestra la agrupación de los especímenes / individuos de la misma especie animal en base a las 14 especies lipídicas de DAGs que correlacionan con la longevidad máxima.

**Figura S1.** Grado de insaturación de los DAGs identificados, agrupados según el número de átomos de carbono, e independientemente de su grado de correlación con la longevidad. En cuadrados rojos, las diferentes especies lipídicas de DAGs que correlacionan con la longevidad máxima, y en triángulos verdes, aquellas especies lipídicas de DAGs que no correlacionan con la longevidad.

**Tabla 1.** Correlación de *Spearman* entre los 47 DAGs identificados y la longevidad máxima.

DAG	Nº Carbonos	Nº Dobles Enlaces	r	p-valor
DAG(39:6)	39	6	-0,437	4,79E-07
DAG(44:3)	44	3	-0,381	1,46E-05
DAG(39:4)	39	4	-0,363	3,88E-05
DAG(37:4)	37	4	-0,356	5,66E-05
DAG(38:4)	38	4	-0,331	1,96E-04
DAG(42:7)	42	7	-0,320	3,20E-04
DAG(39:7)	39	7	-0,297	0,001
DAG(42:3)	42	3	-0,287	0,001
DAG(42:8)	42	8	-0,269	0,003
DAG(37:3)	37	3	-0,262	0,004
DAG(44:5)	44	5	-0,260	0,004
DAG(32:2)	32	2	-0,236	0,009
DAG(44:4)	44	4	-0,216	0,017
DAG(38:3)	38	3	-0,213	0,018
DAG(40:3)	40	3	-0,163	0,073
DAG(38:0)	38	0	-0,148	0,104
DAG(44:6)	44	6	-0,138	0,130
DAG(44:3)	44	3	-0,131	0,151
DAG(42:4)	42	4	-0,120	0,186
DAG(44:8)	44	8	-0,113	0,216
DAG(44:9)	44	9	0,082	0,366
DAG(41:4)	41	4	0,076	0,403
DAG(40:0)	40	0	0,068	0,459
DAG(44:9)	44	9	0,064	0,480
DAG(44:9)	44	9	0,057	0,536
DAG(42:7)	42	7	0,047	0,608
DAG(37:4)	37	4	-0,043	0,635
DAG(43:4)	43	4	0,042	0,649
DAG(40:1)	40	1	0,041	0,650
DAG(38:6)	38	6	-0,040	0,660
DAG(40:0)	40	0	0,040	0,662
DAG(44:2)	44	2	0,039	0,669
DAG(43:3)	43	3	0,037	0,685

<b>DAG(43:5)</b>	43	5	0,037	0,686
<b>DAG(40:1)</b>	40	1	0,032	0,724
<b>DAG(44:7)</b>	44	7	0,030	0,743
<b>DAG(40:4)</b>	40	4	0,022	0,806
<b>DAG(42:9)</b>	42	9	0,022	0,812
<b>DAG(42:8)</b>	42	8	0,021	0,819
<b>DAG(36:0)</b>	36	0	0,019	0,838
<b>DAG(40:1)</b>	40	1	0,013	0,885
<b>DAG(44:7)</b>	44	7	0,011	0,907
<b>DAG(43:3)</b>	43	3	0,010	0,909
<b>DAG(34:1)</b>	34	1	0,007	0,938
<b>DAG(41:2)</b>	41	2	-0,006	0,951
<b>DAG(43:2)</b>	43	2	-0,001	0,989
<b>DAG(42:0)</b>	42	0	-0,001	0,989

**Tabla 2.** Análisis de regresión no lineal entre el contenido de los 14 DAGs y la longevidad máxima.

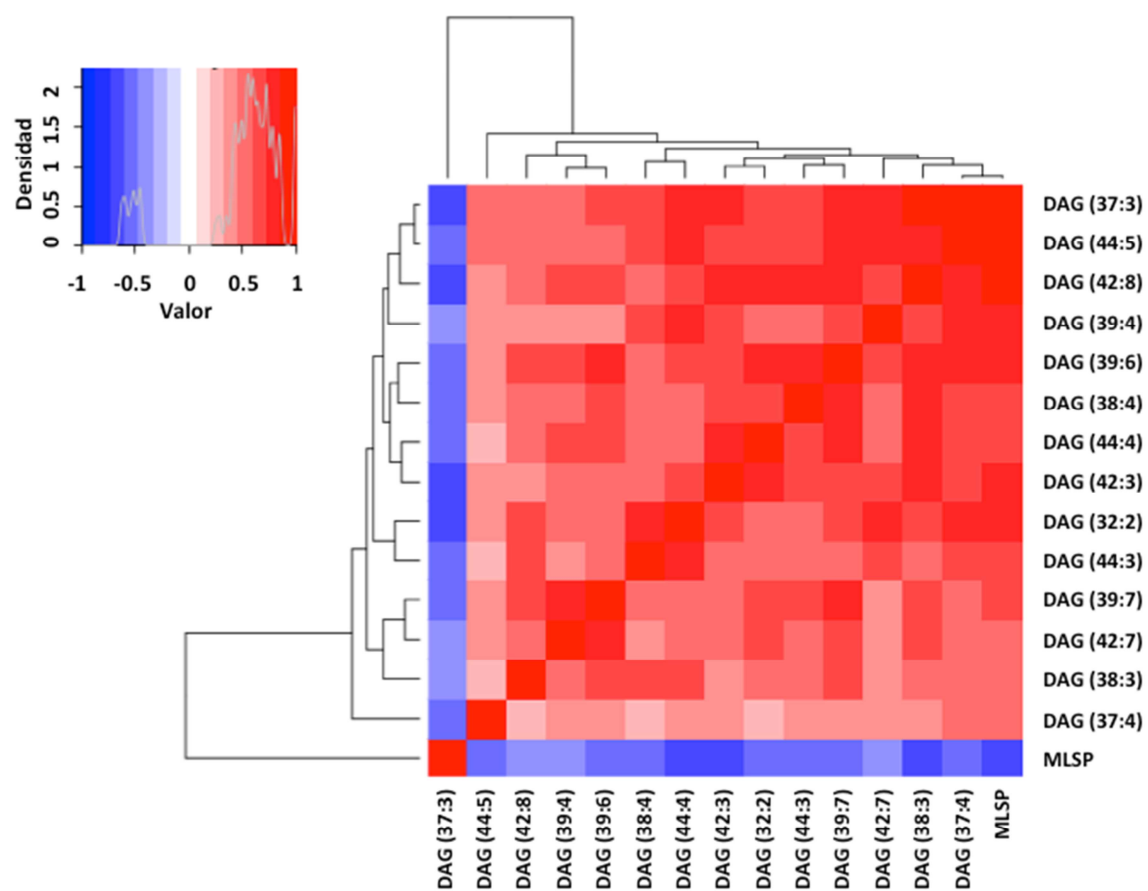
DAG	Ecuación	R <sup>2</sup>
DAG(39:7)	$y = 22,13 * \exp(-0,095*x) + -0,36$	0,4649
DAG(39:6)	$y = 8,564 * \exp(-0,095*x) + 0,585$	0,457
DAG(37:3)	$y = 4,899 * \exp(-0,073*x) + 0,404$	0,3583
DAG(32:2)	$y = 5,469 * \exp(-0,072*x) + 0,302$	0,3545
DAG(42:7)	$y = 0,00436x^2 - 0,664x + 17,8$	0,3247
DAG(44:3)	$y = 10,062 * \exp(-0,073*x) + 0,178$	0,3241
DAG(38:3)	$y = 7,022 * \exp(-0,064*x) + 0,236$	0,2981
DAG(44:5)	$y = 4 * \exp(-0,073*x) + 0,569$	0,2916
DAG(39:4)	$y = 4,505 * \exp(-0,068*x) + 0,522$	0,2585
DAG(38:4)	$y = 10875,1 * \exp(-0,05*x) + -893,1$	0,1128
DAG(42:8)	$y = 3,272x^2 - 501,6x + 13176$	0,112
DAG(37:4)	$y = 0,2364x^2 - 49,29x + 2500$	0,05734
DAG(42:3)	$y = 0,394x^2 - 73,41x + 3174$	0,03805
DAG(44:4)	$y = 0,2247x^2 - 34,39x + 1099$	0,03333



**Tabla 3.** Análisis de bosques aleatorios (*Random Forest*) entre los 14 DAGs y la longevidad máxima.

	<i>M. musculus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>C. porcellus</i>	<i>O. cuniculus</i>	<i>O. aries</i>	<i>C. familiaris</i>	<i>S. scrofa</i>	<i>B. taurus</i>	<i>F. catus</i>	<i>E. caballus</i>	<i>H. sapiens</i>	Error de clasificación
<i>M. musculus</i>	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,167
<i>R. norvegicus</i>	1	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1
<i>C. porcellus</i>	0	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0
<i>O. cuniculus</i>	0	3	0	5	0	0	1	0	1	0	0	0,5
<i>O. aries</i>	0	0	0	0	11	0	0	0	0	0	1	0,0833
<i>C. familiaris</i>	0	0	0	0	0	10	0	0	1	0	1	0,167
<i>S. scrofa</i>	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0,0
<i>B. taurus</i>	0	0	0	0	1	1	0	7	0	0	0	0,222
<i>F. catus</i>	0	0	0	0	0	3	0	0	8	0	1	0,333
<i>E. caballus</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	11	0	0,0833
<i>H. sapiens</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	12	0,2

Figura 1



**Figura 2**

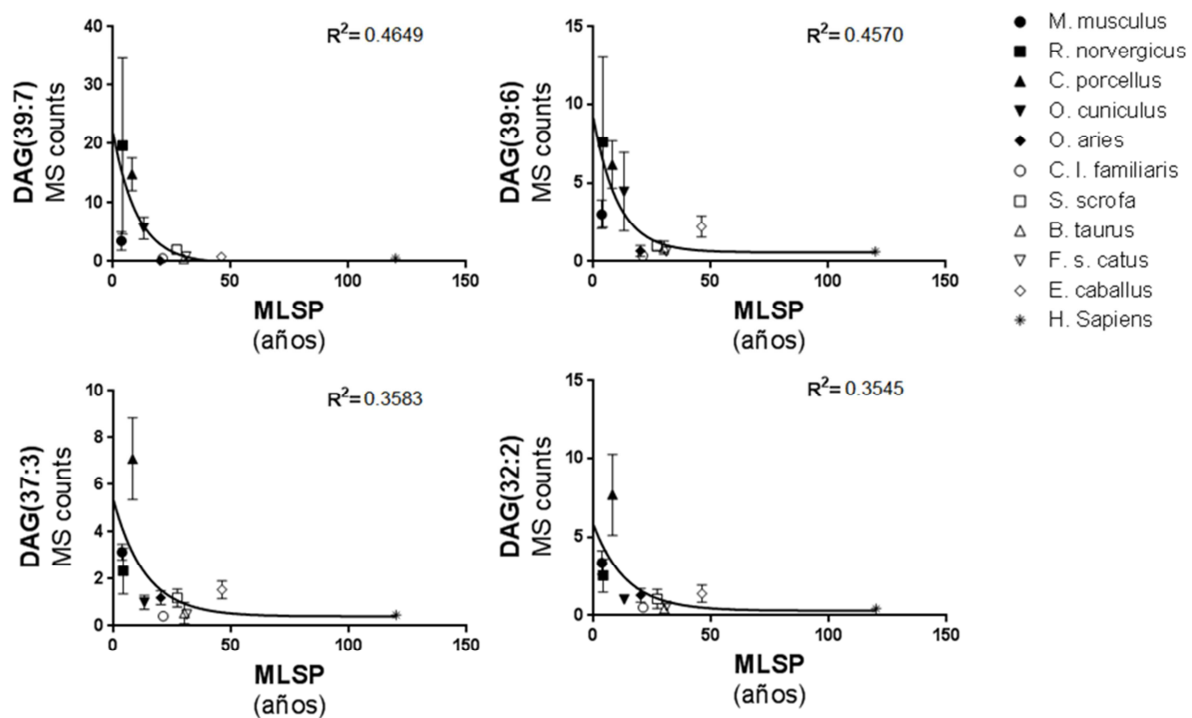


Figura 3

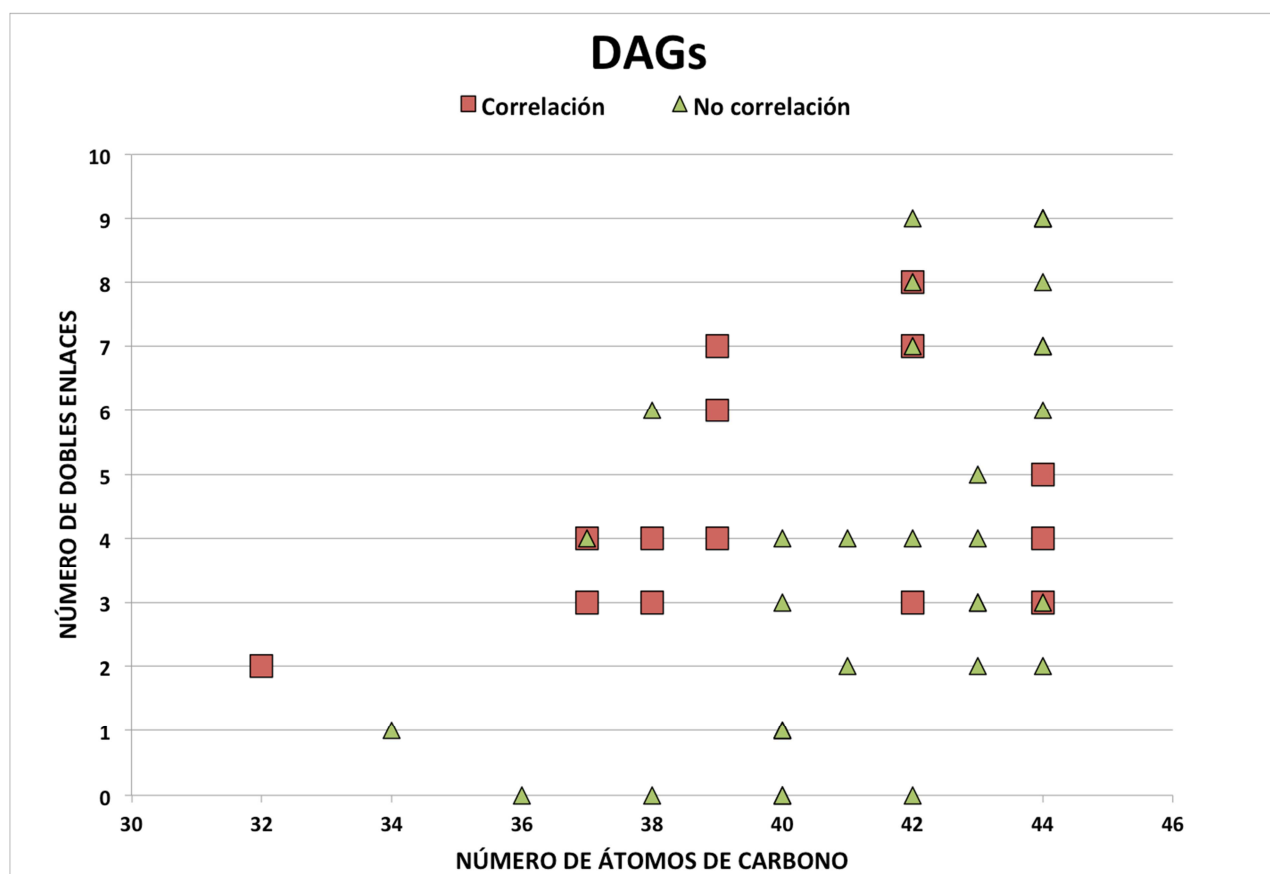


Figura 4

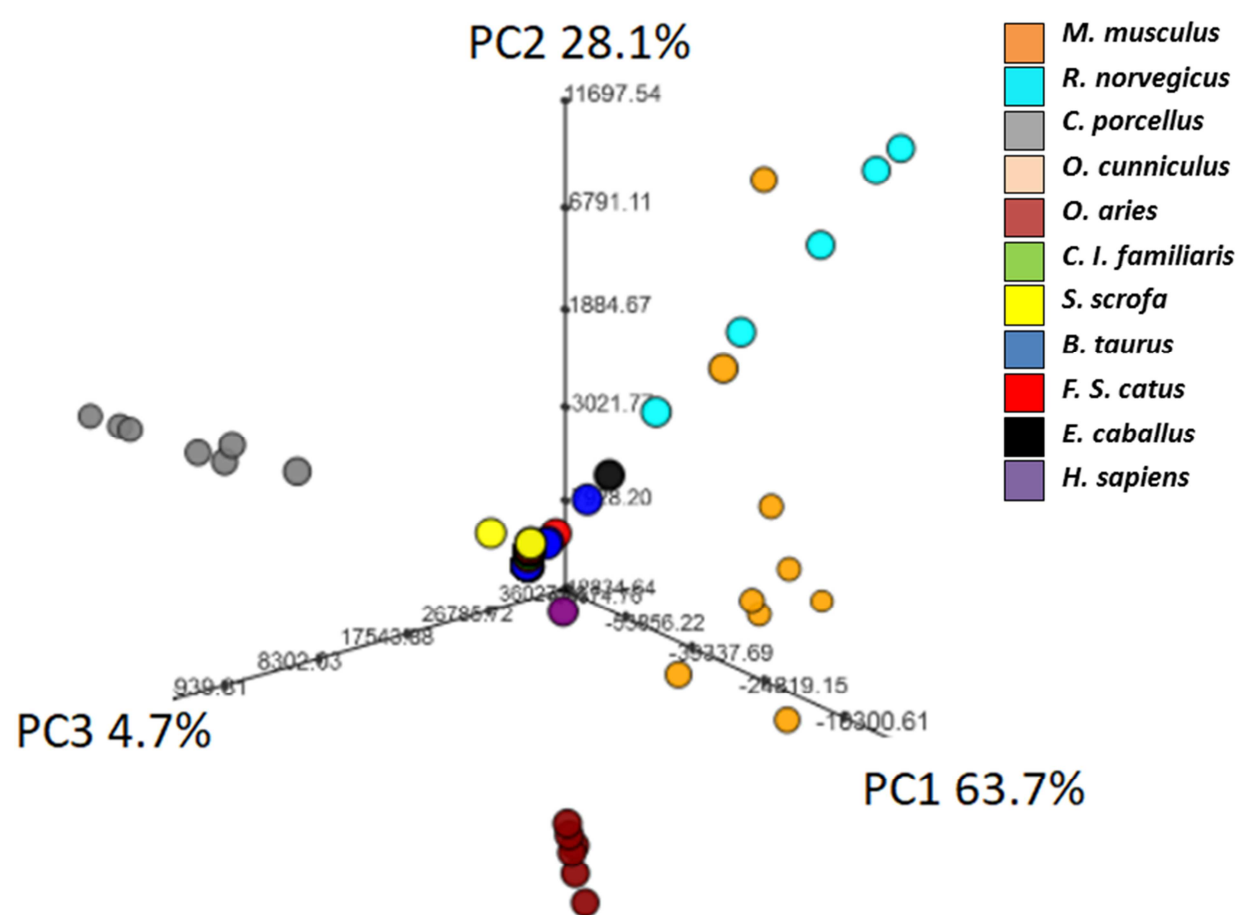


Figura S1

